



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  A23L 1/03, 1/164		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/16077  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Mai 1997 (09.05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT96/00212	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).		
(22) Internationales Anmeldedatum: 4. November 1996 (04.11.96)			
(30) Prioritätsdaten: A 1809/95 2. November 1995 (02.11.95) AT			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ED. HAAS NÄHRMITTEL GESELLSCHAFT MBH [AT/AT]; Eduard-Haas-Strasse 25, A-4050 Traun (AT).			
(72) Erfinder; und			Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KNEIFEL, Wolfgang [AT/AT]; Georg-Franz-Kollerstrasse 17A, A-2102 Bisamberg (AT). RAFFALT, Josef [AT/AT]; Reinfeldsdorf 2, A-9431 St. Stefan (AT). VIERNSTEIN, Helmut [AT/AT]; Gymnasiumstrasse 26/18, A-1180 Wien (AT).			Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.
(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).			

(54) Title: PROBIOTICALLY ACTING FORMULATIONS

(54) Bezeichnung: PROBIOTISCH WIRKSAME FORMULIERUNGEN

## (57) Abstract

The invention relates to a probiotically acting formulation which contains micro-organisms stabilised by lyophilisation, and a food carrier which allows the lyophilised micro-organisms to pass through the gastric juice in a higher germination index. The lyophilised micro-organisms in the carrier are melted. The invention also relates to the use of said formulation as a food additive and food, in particular muesli, containing this formulation.

## (57) Zusammenfassung

Beschrieben wird eine probiotisch wirksame Formulierung enthaltend durch Lyophilisierung stabilisierte Mikroorganismen und einen lebensmitteltechnischen Trägerstoff, welcher den lyophilisierten Mikroorganismen einen Magensaft-Durchtritt in höherer Keimzahl ermöglicht, wobei die lyophilisierten Mikroorganismen im Trägerstoff eingeschmolzen sind, deren Verwendung als lebensmitteltechnischer Zusatzstoff sowie Lebensmittel, insbesondere Müsli, enthaltend diese Formulierung.

- 1 -

### Probiotisch wirksame Formulierungen

Die Erfindung betrifft probiotisch wirksame Formulierungen, insbesondere zur Anwendung im Bereich der Lebensmitteltechnologie.

Als "Probiotika" werden nach einer modernen Definition (Havenaar et al., "Probiotics: A General View" in: "The Lactic Acid Bacteria, Volume 1", B.J.B. Wood Ed. (1992), Elsevier Applied Science, 155/156) Mono- oder Mischkulturen lebender Mikroorganismen bezeichnet, die an Tier und Mensch angewendet werden und den Wirt durch die Verbesserung der Eigenschaften der natürlich vorhandenen Mikroflora vorteilhaft beeinflussen. Das bedeutet, daß der Begriff Probiotika nur auf Produkte zutrifft, die

- lebende Mikroorganismen enthalten (z.B. als gefriergetrocknete Zellen oder in fermentierten Produkten),
- den Gesundheitsstatus von Mensch und Tier verbessern,
- die Wirkung im Mund, dem gastrointestinalen Trakt, dem oberen respiratorischen Trakt oder dem Urogenitaltrakt entfallen können.

Der Begriff "Milchsäurebakterien" (MSB) umfaßt eine Kategorie von Mikroorganismen, die in den letzten Jahren, bedingt durch ihre humanspezifischen und lebensmitteltechnologischen Eigenschaften, in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt sind und in zunehmenden Ausmaß in probiotischen Zusammensetzungen vorgesehen werden.

Taxonomisch beinhaltet das Spektrum der Milchsäurebakterien derzeit im wesentlichen die Gattungen *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium* und *Sporolactobacillus* (Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, IX. Aufl.). Einige dieser Vertreter (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Enterococcus*) gelten als natürliche und nütz-

rungsgewohnheiten - d.h. unterschiedlichen nativen Keimzahlen auf. Allgemein wird die Wirkung der Milchsäurebakterien in vier Haupteffekte unterteilt:

- 2 -

1. Biochemische (u.a. Verbesserung der Nährstoffverwertung)
2. Physiologische (u.a. Stimulierung der Darmperistaltik)
3. Antimikrobielle (z.B. repressive Wachstumshemmung pathogener Keime)
4. Kompetitive (z.B. Inaktivierung von Enterotoxinen).

Die Erhaltung einer ausgewogenen Mikroflora des Darms durch die Applikation bestimmter MSB über den Nahrungsmittelweg erscheint daher aus den obgenannten Gründen als zielführend. Im Vordergrund stehen heute diätetische, prophylaktische und therapeutische Indikationen, wie u.a. bei Reisediarrhoe, Behandlung von Obstipationen, Restitution einer gestörten Darmflora nach Antibiotikaeinnahme, regulierende Funktion bei Stress-Situationen, Erniedrigung des Cholesterinspiegels, Krebstherapie, Zahnfleischentzündungen, Vaginitis, bei diversen Diätformen, etc..

Menschen auf der ganzen Erde haben mit MSB fermentierte Milchprodukte (fMP) als gesunde Nahrung seit sehr langer Zeit zu sich genommen. Seit 1966 wird die Konsumation von fMP von der International Dairy Federation erfaßt und aufgezeichnet. Die Konsumation von Joghurt hat z.B. beträchtlich zugenommen, vermutlich wegen dem wahrnehmbaren gesundheitlichen Nutzen (pro Kopf-Konsumation 1987 in Österreich: 7 kg; in Deutschland (West): 9,7 kg; Spanien: 7,3 kg; Schweiz: 16,5 kg; Fernandes et al., "Fermented Dairy Products and Health" in: "The Lactic Acid Bacteria, Volume 1", B.J. Wood Ed. (1992), Elsevier Applied Science, 298). Diese herkömmlichen Lebensmittel enthaltende lebende Mikroorganismen jedoch in zu niedriger Konzentration und erfüllen nicht die notwendigen Voraussetzungen, um die für eine effiziente Wirkung unbedingt notwendige

and Marketing of Probiotic Products ... Human Health: The Contribution of Microorganisms", S.A.W. Gibson Ed. (1994), Springer Verlag, 160).

Für die Funktionalität lebensfähiger bzw. lebender Milchsäure-

- 3 -

bakterien ist entscheidend, daß sie in genügend hoher Keimdichte aufgenommen werden, da durch die natürlichen Barrieren ständig die Abtötung von Mikroorganismen erfolgt.

Insbesondere bei der direkten peroralen Verabreichungsform lebensfähiger Mikroorganismen ist zu beachten, daß je nach Gattung bzw. Stamm der größte Teil der Bakterien bereits im Magen aufgrund des dort vorherrschenden sauren Millieus zerstört wird.

Lebende Mikroorganismen sind schwer stabilisierbar, in Präparationen liegen sie daher meist in getrockneter Form vor. Die Darstellung kann durch unterschiedliche Trocknungsprozesse, wie Lyophilisation, Sprühtrocknung, etc. erfolgen.

Die Verarbeitung zu Tabletten mit magensaftresistenten Filmüberzügen ist problematisch: einerseits ist das Überzugsmaterial (z.B. Eudragit<sup>®</sup>) für Lebensmittelprodukte nicht zugelassen, andererseits wird die Anzahl der lebensfähigen Mikroorganismen durch den Tablettierungsvorgang aufgrund der einwirkenden Scherkräfte meist stark reduziert. Eine Verabreichung in magensaftresistenten Hartgelatinekapseln bleibt wegen der speziellen und teuren Technologie auf den pharmazeutischen Bereich beschränkt.

Schließlich sind bei vielen auf dem Markt befindlichen Produkten erhebliche Qualitätsschwankungen festzustellen. Das liegt hauptsächlich daran, daß die großtechnische Herstellung und Verarbeitung von probiotisch wirksamen Formulierungen aufgrund ihrer biologischen Natur heikel und nur schwer reproduzierbar ist (Brennan et al., J.Food Prot. 46 (1983), 887-892).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, eine probiotisch wirksame Formulierung zur Verfügung zu stellen, welche

reproduzierbarer Weise auch großtechnisch hergestellt und verwendet werden kann. Darüberhinaus sollten diese Formulierungen eine hohe Lagerstabilität aufweisen, was insbesondere bei derart empfindlichen Produkten von großer Bedeutung ist.

- 4 -

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine probiotisch wirksame Formulierung umfassend durch Lyophilisierung stabilisierte Mikroorganismen und einen lebensmitteltechnischen Träger- und Hüllstoff, welcher den durch Lyophilisierung stabilisierten Mikroorganismen einen Magensaft-Durchtritt in einer mindestens um das Zehnfache höherer Keimzahl, verglichen mit der reinen, getrockneten Mikroorganismen-Präparation, ermöglicht, wobei die durch Lyophilisierung stabilisierten Mikroorganismen im Trägerstoff eingeschmolzen oder - im Falle von flüssiger oder breiiger Konsistenz des Trägerstoffes - in diesem Trägerstoff suspendiert ist.

Die Besonderheit der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß eine mikroorganismenhältige Formulierung hergestellt wird, die einen hohen Grad an Magensaftresistenz aufweist und einfach zu verarbeiten ist. Die Herstellung kann mit hoher Reproduzierbarkeit auch großtechnisch durchgeführt werden; die erhaltenen Formulierungen eignen sich hervorragend als Zusatz zu Lebens- und Genußmitteln.

Erst die Einbettung in geeignete lebensmitteltechnische Trägerstoffe ermöglicht, daß eine überraschend hohe Anzahl von lebenden Zellen in den Darm gelangen können. Die bisher verwendeten magensaftresistenten Lacke wie Eudragit® sind nur zur Verabreichung von äußerst limitierten Mengen erlaubt, sie sind aber nicht Lebensmittel-tauglich und insbesondere ungeeignet bei den Mengen an probiotisch wirksamen Formulierungen, welche zwangsläufig beim Verzehr eingenommen werden.

Besonders bevorzugte lebensmitteltechnische Träger- und Hilfsstoffe sind Pflanzenfette bzw. Pflanzenfett-Produkte. Dazu sind erfindungsgemäß besonders zu zählen: flüssige Pflanzenöle auf Basis von Naturstoffen mit geringen Anteilen (unter 3 %) von ungesättigten Fettsäuren (incl. handelsübliche teilhydrierte Öle, die

sprungs mit teilweiser oder insbesondere jene mit vollständiger Hydrierung, oder andere Kakao-Produkte, wie insbesondere Schokolade. Die erfindungsgemäßen Träger- und Hilfsstoffe zeichnen sich durch weitgehende Wasserfreiheit aus, d.h. ihr Wassergehalt liegt unter 0,5 %, vorzugsweise unter 0,01 %, insbesondere unter 0,001 %.

- 5 -

Diese Träger- und Hüllstoffe bilden einen effizienten Schutz nicht nur gegen Feuchtigkeit bei der Lagerung, sondern auch bei der Magen-Passage. Weiters wird durch die einfache Möglichkeit der Verarbeitung (Einschmelzug, Suspension) die technologische Umsetzung zu fertigen Lebens- und Genußmitteln sehr erleichtert. Der Träger- und Hüllstoff kann im einfachsten Anwendungsfall direkt als Schmelze appliziert werden und haftet nach dem Erkalten auf dem Lebens- bzw. Genußmittel an dessen Oberfläche an. Weiters wird durch das Vorliegen in eingeschmolzener bzw. suspendierter Form die weitere Verarbeitung erheblich erleichtert, da auch hierbei der Trägerstoff den empfindlichen Mikroorganismen diese Schutzhülle bietet.

Die erfindungsgemäßen Präparationen können in einfacher Weise in komplexere Lebensmittel eingearbeitet werden. So kann die Schokolade, in welche die lyophilisierten Mikroorganismen eingeschmolzen worden sind, leicht zur Herstellung eines diätetisch wertvollen Müesli, Schokoriegel oder Kakaogetränk verwendet werden. Dies gilt natürlich auch für die anderen Pflanzenfette, insbesondere die vollständig hydrierten Pflanzenfette, wobei in diesem Fall das Anwendungsspektrum noch erheblich größer ist. Diese können beispielsweise für Konditoreiwaren oder Füllungen aller Art in der Lebensmittelindustrie Anwendung finden.

Die Einbringung der Mikroorganismen in den Trägerstoff kann insbesondere zwei Probleme aufwerfen. Bedingt durch die Schmelzwärme können lyophilisierte Michsäurebakterien geschädigt werden. Es sollten daher nicht allzu hohe Temperaturen bei der Herstellung angewendet werden dürfen. Als feste Trägerstoffe kommen daher solche Stoffe in Betracht, welche sich schon bei Temperaturen unter 60°C, vorzugsweise unter 50°C oder - noch bevorzugter - bei maximal 40°C, zumindest teilweise verflüssigen lassen. Beim Ein-

... den Trägerstoff eingearbeitet werden..

Das zweite große Problem bei der Verarbeitung liegt in den nachteiligen hygroskopischen Eigenschaften des Lyophilisats selbst. Lyophilisate weisen nach dem Gefriertrocknungsprozeß  $\omega_w$ -Werte im

- 6 -

Bereich von 0,1 bis 0,15 auf. Sie sind befähigt, aus der Umgebung Wasser rasch in großer Menge aufzunehmen. Da in jedem Milchsäurebakterien-Lyophilisat Nährbodenreste enthalten sind, wird durch die Wasseraufnahme unmittelbar eine Initialisierung der Lebensvorgänge in den Mikroorganismen herbeigeführt. Dies gilt selbstverständlich noch mehr für Bakterien-Präparate, welche nicht als Lyophilisate vorliegen, sondern beispielsweise als sprüh- oder wärmegetrocknete Joghurt-, Voll- oder Magermilchkulturen, da jene noch einen viel höheren Gehalt an Nährstoffen aufweisen und daher eine Initialisierung der Lebensvorgänge bei der lebensmitteltechnologischen Verarbeitung dieser Präparationen nicht verhindert werden kann.

Erfindungsgemäß werden daher ausschließlich lyophilisierte Mikroorganismen verwendet, wobei diese vorzugsweise einen Restgehalt an Nährstoffen oder anderen Beimengungen von weniger als 10 %, besonders bevorzugt weniger als 5 %, meist um 3 % auf.

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden die lyophilisierten Mikroorganismen direkt in die geeigneten Träger- und Hüllstoffe eingebracht (z.B. eingeschmolzen), wodurch diese Stoffe sofort ihre Schutzwirkung entfalten können und ein Kontakt zur Umgebungsluft (und der darin enthaltenen Feuchtigkeit) weitgehend vermieden wird. Durch die erfindungsgemäßen Träger- und Hilfsstoffe wird also eine luftdichte und wasserabstoßende Einbettung der lyophilisierten Mikroorganismen ermöglicht, wodurch die Lagerstabilität der gewonnenen Formulierungen gegenüber den bisher in der Lebensmitteltechnologie verwendeten Präparaten entscheidend verbessert wird. Die erfindungsgemäßen probiotischen Formulierungen aus lyophilisierten Mikroorganismen und Träger- und Hüllstoff weisen daher einen  $a_w$ -Wert von unter 0,1, vorzugsweise zwischen 0,05 und 0,1, auf. Ermittelt werden diese Werte durch Messung der ErH

Überraschenderweise haben diese Trägerstoffe auch einen Magensaftresistenz-verleihenden Effekt auf die Mikroorganismen. Diese Trägerstoffe ermöglichen offensichtlich eine effiziente Schutzhülle, welche durch die Magensaft nicht oder nur leicht an

- 7 -

gegriffen wird, um die Bakterien, sodaß diese in hoher Keimzahl in den Darm gelangen können.

Als lyophilisierte Mikroorganismen werden im besonderen Stämme aus den Familien Lactobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* und *Bifidobacterium*, und Enterobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen *Enterobacter* und *Escherichia* in den erfindungsgemäßen Formulierungen verwendet, wobei die Arten *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* (sowie weitere *Bifidobacterium*-Arten) und physiologische *Escherichia coli* sowie Mischungen dieser Mikroorganismen besonders bevorzugt sind.

Bei den erwähnten Arten ist ihre physiologisch bedeutsame probiotische Wirkung schon hinlänglich beschrieben worden; ihre lebensmitteltechnisch große Bedeutung macht sie zu bevorzugten Mikroorganismen im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

Die erfindungsgemäße Formulierung umfaßt günstigerweise weiters Formulierungshilfsstoffe oder technisch notwendige Hilfsstoffkomponenten, wie Emulgatoren (z.B. Ei- und Soja-Lecithin) und Antioxidantien (z.B. Ascorbylpalmitat und div. Tocopherole). Die eingesetzte Konzentration dieser Stoffe richtet sich nach den lebensmitteltechnologisch gängigen Mengen.

Die erfindungsgemäße probiotisch wirksame Formulierung umfaßt in der Regel

- 1 bis 90 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 30 Gew.-%, durch

Lyophilisierung stabilisierte Mikroorganismen

- 0 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 5 Gew.-%, Hilfsstoffe

Eine besonders bevorzugte probiotisch wirksame Formulierung umfaßt unter Lyophilisierung stabilierte Mikroorganismen der Art *Lactobacillus*

- 8 -

acillus acidophilus und Schokolade.

Besonders bevorzugt sind Formulierungen, welche 10 bis 25, insbesondere 15 bis 23 Gew.-%, an lyophilisierten Mikroorganismen aufweisen.

Die Erfindung betrifft selbstverständlich auch Lebensmittel aller Art, welche eine erfindungsgemäße probiotisch wirksame Formulierung umfassen, insbesondere Reformprodukte, welche diätetisch besonders wertvoll sein müssen. Besonders bevorzugt sind Müsliprodukte, Müsliriegel, Ballaststoffprodukte, Sojaprodukte und diätetisch besonders anspruchsvolle Konditor-Waren.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen probiotisch wirksamen Formulierungen als Zusatzstoffe für Lebensmittel oder Arzneimittel, insbesondere zur Herstellung einer Präparation oder eines Lebensmittels zur Unterstützung der Behandlung von Störungen der Darmflora.

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Schokomüsli, welches die folgende Zusammensetzung aufweist:

70 bis 90 Gew.-% Getreideflocken  
1 bis 15 Gew.-% Nüsse und Trockenfrüchte,  
1 bis 10 Gew.-% Kohlehydrate, vorzugsweise umfassend  
Sirupe als Bindemittel,  
1 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 2 bis 5 Gew.-%, erfindungsgemäße probiotische Formulierung  
0 bis 1 Gew.-%, Aromen  
0 bis 0,01 Gew.-% Antioxidantien

Als Getreideflocken werden hauptsächlich Haferflocken und Weizen-

gerste-Flocken eingesetzt. Als Nüsse und Trockenfrüchte werden essbare genießbare Sorten verwendet werden, vorzugsweise natürlich Haselnüsse, Walnüsse, Kokosnüsse, Mandeln, Pecannüsse und Erdnüsse.

- 9 -

Das erfindungsgemäße Müsli kann zusätzlich Früchte aller Art, vorzugsweise getrocknete Früchte, enthalten. Bevorzugt sind dabei Rosinen, getrocknete bzw. gepulverte Pfirsiche, Marillen, Orangen, Zitronen, Äpfel und Birnen.

Das Müsli kann zusätzlich noch geeignete Bestandteile, wie z.B. Aromastoffe, Süßstoffe, weitere Ballaststoffe, Vitamine, Mineralstoffe, extrudierte Cerealien-Produkte, enthalten.

Ein weiters bevorzugtes Müsli gemäß der vorliegenden Erfindung enthält:

30 bis 90 Gew.-% Haferflocken und Nüsse  
1 bis 70 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 20 Gew.-%, Schokoladekomponenten, wobei diese zumindest 1 Gew.-% einer probiotisch wirksamen Formulierung mit Schokolade als Träger- und Hüllstoff enthalten,  
0 bis 69 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 30 Gew.-% Fruchtanteile  
0 bis 20 Gew.-% Zucker und  
0 bis 20 Gew.-% sonstige Bestandteile.

Schokoladekomponenten sind beispielsweise Milchschokolade, Kochschokolade, Kakao, extrudierte Schokolade, Bitterschokolade, Schoko-flocken oder -streusel, aber auch geeignete Schokolade-Ersatzstoffe, wie z.B. Carobin, und natürlich eine erfindungsgemäße probiotisch wirksame Präparation, bei welcher die durch Trocknung stabilisierten Mikroorganismen in Schokolade eingeschmolzen sind.

Ein weiteres spezielles erfindungsgemäßes Müsli enthält:

50 bis 70 Gew.-% Getreideflocken und Nüsse  
1 bis 40 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 20 Gew.-%, Schokoladekomponenten, wobei diese zumindest 1 Gew.-%

2 bis 15 Gew.-% Fruchtanteile  
0 bis 10 Gew.-% Zucker und  
0 bis 10 Gew.-% sonstige Bestandteile.

- 10 -

Das erfindungsgemäße Müsli weist eine abgestimmte Komposition der Bestandteile auf, welche eine gute probiotische Wirkung der erfindungsgemäßen Formulierung besonders unterstützt.

Vorzugsweise ist das Müsli als Knabberprodukt formuliert, wobei Zuckersirupe als Bindemittel zur Agglomeration der Müslibestandteile dienen und ein Backprozeß dem Müsli selbst einen typischen Geschmack und den erforderlichen niedrigen Restwassergehalt, somit niedrige Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert < 0,3) verleiht. Das beschriebene Müsli kann demjenigen gemäß dem Stand der Technik zur Herstellung von Frühstückscerealien entsprechen, wobei die Aufbringung der erfindungsgemäßen Formulierung auf das Sirup-gebundene Müsli gesondert erfolgen kann.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen probiotisch wirksamen Formulierungen erfolgt vorzugsweise derart, daß die durch Lyophilisierung stabilisierten Mikroorganismen in den Trägerstoff eingeschmolzen bzw. im Falle von flüssiger oder breiiger Konsistenz des Trägerstoffes, in diesem Trägerstoff suspendiert werden und anschließend der Mikroorganismen enthaltende Trägerstoff mit den übrigen Komponenten der Formulierung gemischt (vorzugsweise granuliert) und gegebenenfalls verarbeitet und/oder verpackt wird.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgende Beispiele, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert.

Beispiele:

1.: Herstellung der probiotisch wirksamen Schokolade-Präparation:

Ein *L.acidophilus*-Lyophilisat mit einem Lebendkeimgehalt von ca.  $6,6 \times 10^9$  KbE (KbE= Kolonie-bildende Einheiten) pro Gramm wurde mit geriebener Schokolade im Verhältnis von 1 zu 6 vermengt - das

Formulierung wurde diese mitteils Hobel zerkleinert (Partikelgröße: 0,5 - 5,0 mm).

- 11 -

2.: Herstellung eines erfindungsgemäßen Schoko-Müsli

Ein Schokomüsli der folgenden Zusammensetzung wurde durch Mischung der angegebenen Komponenten in einem Kubusmischer (Fa. Erweka) hergestellt:

<u>Bestandteile:</u>	<u>Gew.-%</u>
Getreideflocken und Nüsse	63
Rosinen	5
Milchschokolade	2,5
extrudierte Schokolade	1,5
Kochschokolade	7
Schokolade mit L.acidophilus	18
Kakao	1
<u>Zucker</u>	<u>2</u>
<u>Gesamt</u>	<u>100</u>

3.: Keimgehalte im fertigen Acidophilus-Schokomüsli:

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgte nach dem Koch'schen Plattenverfahren.

Der Lebendkeimgehalt an Lactobacillus acidophilus wurde auf Rogosa-Agar mittels Plattierung verschiedener Verdünnungen des Ausgangsmaterials bestimmt. Die Platten wurden für 72 h bei 37°C im anaeroben Milieu inkubiert und die erhaltenen Kolonien gezählt.

Ergebnis:

Lebendkeimzahl in KbE/g

L.acidophilus 2,0 - 5,0 x 10<sup>7</sup>

Das Schokomüsli mit der erfindungsgemäßen probiotisch wirksamen Formulierung wurde einer Gruppe von sechs Testpersonen in einem Blindversuch zur Verkostung vorgelegt. Als Vergleichsprodukt diente das Standardprodukt "Heavenly Choco Muesli" der Edima Haas. Bei-

- 12 -

urteilt wurden die sensorischen Eigenschaften der Produkte. Besondere Beachtung wurde auf die Untersuchung nach etwaigem Vorhandensein von Fremdgeschmack im Müsli gelegt. Für die Verkostung wurden jeweils 50 g Müsli mit 100 ml temperierter Milch (ca. 25°C) gemischt.

Von allen Testern wurde das Schokomüsli mit den erfindungsgemäßen probiotisch wirksamen Formulierungen positiv bewertet. Es wurde als ausreichend und angenehm nach Schokolade schmeckend beurteilt und einhellig als "Schokomüsli" bezeichnet. Ein störender Fremdgeschmack wurde von keiner der Testpersonen festgestellt.

Das Vergleichsprodukt Haas-Schokomüsli in bestehender Form wurde von den Testern als typisches Müsli, ohne ausgeprägte oder abweichende Geschmackseigenschaften, charakterisiert.

5.: Untersuchungen zur Magensaftresistenz der erfindungsgemäßen Schokomüsli:

Bestimmung der Überlebenskeimzahl nach Inkubation in 0,1 N HCl

Zur Simulation einer Magenpassage wird 1,00 g der Müsli-Probe mit 94,0 ml 0,1 N HCl versetzt und 1 h am Schüttelwasserbad (Firma GFL, Type: 1083) bei 37°C inkubiert. Anschließend wird mit 2 ml 5 N NaOH und 3 ml einer wäßrigen 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung neutralisiert (ca. pH 7-10). Die Bestimmung der Überlebenskeimzahl erfolgte gleichfalls auf Rogosa-Agar (anaerobes Milieu, 72 h, 37°C).

Ergebnisse

	<u>Keimzahlbestimmung</u>
Lyophilisat	6,6 x 10 <sup>9</sup> /g
nach Magenpassage	negativ in 0,1 g
Probiotisch wirksame Schokolade	...
nach Magenpassage	1,0 x 10 <sup>4</sup> /g
Schoko-Müsli mit Lyophilisat	9,0 x 10 <sup>8</sup> /g
nach Magenpassage	negativ in 0,1 g

- 13 -

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß mit der erfindungsgemäßen probiotisch wirksamen Schoko-Formulierung eine erheblich größere Lebendkeimzahl nach der Magenpassage erreicht werden kann und die in Schokolade eingeschmolzenen Bakterien gegen 0,1 N HCl geschützt sind.

Eine Lebendkeimzahl nach der Magenpassage, welche gemäß der vorliegenden Erfindung um das mindestens 10-fache, vorzugsweise um das mindestens 100-fache, insbesondere um das mindestens 1000-fache, über den mit der reinen, getrockneten Mikroorganismen-Präparation liegt, ist also ohne weiteres mit den erfindungsgemäßen Formulierungen erzielbar.

6.: Herstellung einer probiotisch wirksamen Träger- und Hüllstoffformulierung mit L. acidophilus und CEBES<sup>®</sup>

Ein Lyophilisat von Lactobacillus acidophilus (L.acidophilus 74-2, Wiesby) mit einer garantierten Keimdichte von  $1,0 \times 10^{11}$  KbE/g wurde in einer Menge von 500 g in einer Träger- und Hüllstoffschmelze, bestehend aus 2500 g CEBES<sup>®</sup> (laurischer Kakaobuttersubstitut, Aarhus Olie, DK) und 25 g Ronoxan<sup>™</sup> (Hoffmann-LaRoche, CH) bei einer Temperatur der Schmelze von 40°C eingebracht und gemischt.

7.: Herstellung eines erfindungsgemäßen Müsli mit L. acidophilus

45,5 kg trockenes Kuspermüsli (Firma Haas, AT) wurde in einem Driegerkessel mit der in Beispiel 6 erhaltenen Formulierung überzogen. Diese Teil-Charge wurde auf 1000 kg Gesamtmenge mit unbehandeltem Müsli ergänzt, rückgemischt und verpackt.

8.: Keimzahl-Monitoring

Formulierung: gleiche wie Beispiel 7

- Teilcharge gemäß Beispiel 7:  $3,6 \times 10^7$  KbE/g
- Fertigprodukt gemäß Beispiel 7:  $1,2 \times 10^8$  KbE/g

- 14 -

Plattengußverfahren aus verschiedenen Verdünnungsstufen des Ausgangsmaterials bestimmt. Die Platten wurden für 72 h bei 37°C im anaeroben Millieu inkubiert und die erhaltenen Kolonien ausgewertet.

9.: Sensorik:

Sensorisch war das fertige Müsli vom Vorprodukt (Haas-Müsli, Firma Haas, AT) nicht zu unterscheiden und wies dessen Aroma sowie texturellen Eigenheiten auf.

## A n s p r ü c h e :

1. Probiotisch wirksame Formulierung enthaltend durch Lyophilisierung stabilisierte Mikroorganismen und lebensmitteltechnische Träger- oder Hüllstoffe, welche den lyophilisierten Mikroorganismen einen Magensaft-Durchtritt in einer zumindest um das Zehnfache höheren Keimzahl, verglichen mit der reinen, getrockneten Präparation, ermöglichen, wobei die lyophilisierten Mikroorganismen in den Träger- oder Hüllstoffen eingeschmolzen oder, im Falle von flüssiger oder breiiger Konsistenz der Träger- oder Hüllstoffe, in diesen Träger- oder Hüllstoffen suspendiert sind.
2. Probiotisch wirksame Formulierung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie Pflanzenfette bzw. Pflanzenfettprodukte als Träger- oder Hüllstoff enthalten
3. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die lyophilisierten Mikroorganismen ausgewählt sind aus den Familien Lactobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen Streptococcus, Lactobacillus, Enterococcus und/oder Bifidobacterium, und Enterobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen Enterobacter und/oder Escherichia.
4. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die lyophilisierten Mikroorganismen ausgewählt sind aus den Arten Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus subsp. casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus plantarum, Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Enterococcus faecium Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium in-
5. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend

- 16 -

Lyophilisation stabilisierte Mikroorganismen,

- 10 bis 99 Gew.-%, vorzugsweise 70 bis 90 Gew.-%, lebensmitteltechnische Träger- und Hüllstoffe und
- 0 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 5 Gew.-%, Hilfsstoffe

6. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, sie als Träger- oder Hüllstoffe vollständig hydrierte und wasserfreie Pflanzenfette umfaßt.

7. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, sie als Träger- oder Hüllstoffe Kakao-Produkte, insbesondere Kakabutter oder Schokolade, umfaßt.

8. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie lyophilisierte Mikroorganismen der Art *Lactobacillus acidophilus* und Schokolade umfaßt.

9. Probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie lyophilisierte Mikroorganismen der Art *Lactobacillus acidophilus*, vollständig hydrierte, wasserfreie Pflanzenfette und gegebenenfalls Antioxidantien und Emulgatoren umfaßt.

10. Verwendung von probiotisch wirksamen Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 als Zusatzstoffe für Lebensmittel.

11. Lebensmittel und Genußmittel, insbesondere Reformprodukte, welche eine probiotisch wirksame Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 umfassen.

12. Müsli, umfassend:

70 bis 90 Gew.-% Getreideflocken

Sirupen als Bindemittel,

1 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 2 bis 5 Gew.-%, probiotische Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

- 17 -

0 bis 1 Gew.-%, Aromen  
0 bis 0,01Gew.-% Antioxidantien

13. Schokomüsli, welches die folgende Zusammensetzung aufweist:  
30 bis 90 Gew.-% Haferflocken und Nüsse  
1 bis 70 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 20 Gew.-%, Schokolade-komponenten, wobei diese zumindest 1 Gew.-% einer probiotisch wirksamen Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 enthalten,  
0 bis 69 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 30 Gew.-% Fruchtanteile  
0 bis 20 Gew.-% Zucker und  
0 bis 20 Gew.-% sonstige Bestandteile.

14. Schokomüsli, welches die folgende Zusammensetzung aufweist:  
50 bis 70 Gew.-% Haferflocken und Nüsse  
1 bis 40 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 20 Gew.-%, Schokolade-komponenten, wobei diese zumindest 1 Gew.-% einer probiotisch wirksamen Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 enthalten,  
2 bis 15 Gew.-% Fruchtanteile  
0 bis 10 Gew.-% Zucker und  
0 bis 10 Gew.-% sonstige Bestandteile.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/AT 96/00212

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 A23L1/03 A23L1/164

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A23L A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 014, no. 485 (C-0772), 23 October 1990 & JP 02 200639 A (SHINFUSOU SEIYAKU KK), 8 August 1990, see abstract	1-9
Y	---	10-14
X	FR 2 443 247 A (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.) 4 July 1980	1-11
Y	see page 1, line 28 - page 3, line 5 see page 5, line 15 - line 20	12-14
X	---	1-9
Y	FR 1 584 757 A (CENTRE DE RECHERCHES MARCEL MIDI) 2 January 1970	10-14
Y	see claims; examples 2,5	1-9
X	EP 0 666 031 A (BARILLA G.) 9 August 1995	12-14
Y	see claims; example 1	1-11
	---	12-14
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

24 February 1997

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31 70) 340 2040  
Fax. (+31 70) 340 3014

Authorized officer

REYKEBOSEN, A.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/AT 96/00212

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 1 151 669 A (W. BUHRDEL) 14 May 1969	1-11
Y	see page 3, left-hand column, line 13 - line 23; claims	12-14
Y	---	
	DE 37 38 042 A (LUDWIG SCHOKOLADE GMBH) 26 May 1988	10-14
	see claims	
	---	
P,X	EP 0 704 164 A (FUJI OIL CO., LTD. ET AL.) 3 April 1996	1-14
	see page 5, line 47 - line 54; claims	
	-----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/AT 96/00212

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2443247 A	04-07-80	CH	637297 A	29-07-83
		AU	526326 B	06-01-83
		AU	5329879 A	10-07-80
		BE	880027 A	14-05-80
		DE	2946723 A	19-06-80
		FR	2443279 A	04-07-80
		SE	447540 B	24-11-86
		SE	7909492 A	06-06-80
		US	4332790 A	01-06-82
FR 1584757 A	02-01-70	BE	714791 A	30-09-68
		NL	6807699 A	02-12-68
EP 666031 A	09-08-95	AU	1158595 A	10-08-95
		CA	2141721 A	03-08-95
		JP	8033456 A	06-02-96
GB 1151669 A	14-05-69	CH	525957 A	31-07-72
DE 3738042 A	26-05-88	NONE		
EP 704164 A	03-04-96	JP	8126473 A	21-05-96
		CN	1131511 A	25-09-96